

基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的甘草微波制与传统炮制的差异研究

张育贵, 张淑娟, 吴红伟, 李东辉, 牛江涛, 司昕蕾, 边甜甜, 李越峰*

甘肃中医药大学药学院 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 兰州 730000

摘要: 分别建立生甘草、蜜炙甘草、清炒甘草及微波制甘草的 HPLC 指纹图谱, 生甘草和蜜炙甘草均标定了 17 个共有峰, 炒甘草和微波制甘草均标定了 14 个共有峰, 4、5、11 号峰为生甘草和蜜炙甘草的特有峰; 不同炮制品相对应成分峰面积大小有所不同; 混合对照品指认出的 5 个峰分别为: 2 号峰芹糖甘草苷, 3 号峰甘草苷, 8 号峰异甘草苷, 10 号峰甘草素, 16 号峰甘草酸; 指纹图谱相似度除样品 S5、C1、C5 的相似度在 0.883~0.900 之间外, 其余均大于 0.914, 说明甘草样品经不同方法炮制后总体相对稳定。聚类分析(CA)结果显示, 生甘草、蜜炙甘草能够各自聚类, 能够明确判别; 炒甘草和微波制甘草聚为一类, 无法明确判别。主成分分析(PCA)结果显示甘草四种炮制品基本各自聚类, 有明显差异, 主要差异成分峰为 8 号峰, 是异甘草苷。偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)结果显示甘草四种炮制品各自聚类效果良好, 但清炒甘草和微波制甘草二者比较集中, 结果和 CA 一致。因此, 分别对微波制甘草及清炒甘草、微波制甘草和生甘草、微波制甘草和蜜炙甘草建立正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)模型, 均具有良好的预测能力。OPLS-DA 的差异成分分析变量重要性投影(VIP)结果显示, 微波制甘草和生甘草的主要差异色谱峰为 2、1、8 号色谱峰, 微波制甘草和清炒甘草的差异成分峰为 7、2、9、15、6、13、17、16、14 号色谱峰, 微波制甘草和蜜炙甘草的主要差异色谱峰为 8、13、7、16 号色谱峰。以上研究确定出了甘草经微波加热炮制后与生品、蜜炙品、清炒品的差异成分, 实验方法准确度高, 重复性好, 为现代微波加热炮制方法的可行性提供参考。

关键词: 甘草; 清炒; 蜜炙; 微波制; HPLC 指纹图谱; 化学计量学

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)5-0791-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.5.011

Study on the difference between microwave-processed and traditional-processed licorice based on HPLC fingerprint and stoichiometry

ZHANG Yu-gui, ZHANG Shu-juan, WU Hong-wei,

LI Dong-hui, NIU Jiang-tao, SI Xin-lei, BIAN Tian-tian, LI Yue-feng*

Key Laboratory of Standard and Quality of Chinese Medicine Research of Gansu/Chinese Medicine Pharmaceutical Process Engineering Research Center of Gansu Province, College of Pharmacy in Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: The HPLC fingerprints of raw licorice, honey roasted licorice, stir-fried licorice and microwave-processed licorice were established respectively. Both raw licorice and honey roasted licorice were calibrated with 17 common peaks, but both stir-fried licorice and microwave-processed licorice were calibrated with 14 common peaks. The peaks of No. 4, No. 5, and No. 11 are the unique peaks of raw licorice and honey roasted licorice; the peak areas of the corresponding components of different processed products are different. Five peaks were identified by the mixed reference product. That is, peak 2 is celeryside, peak 3 is glycyrrhizin, peak 8 is isoliquiritin, peak 10 is glycyrrhizin, and peak 16 is glycyrrhizin. The similarity of fingerprints is greater than 0.914 except the samples S5, C1, and C5 is between 0.883-0.900. Various methods of chemometrics can well distinguish four processed products of licorice. Meanwhile, the variable importance projection (VIP) results of OPLS-DA's VIPs have identified the different components of the four processed licorice products. The experimental method has high accu-

收稿日期: 2020-09-10 接受日期: 2021-03-24

基金项目: 国家自然科学基金-地区科学基金(81960713); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室开放基金(ZYZL18-008); 甘肃中医药大学 2019 年研究生创新基金(2020CX41); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放基金(ZYGY202003)

* 通信作者 Tel: 86-931-8765585; E-mail: lyfyxk@126.com

racy and good repeatability, which provides a reference for the feasibility of modern microwave heating processing methods.

Key words: licorice; stir-baking simply; microwave-processed; roasted with honey; HPLC fingerprint; stochiometry

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药等功效,主要用于脾胃虚弱,倦怠乏力,心悸气短,咳嗽痰多,脘腹、四肢挛急疼痛,痈肿疮毒,缓解药物毒性和烈性,在我国药用历史悠久,有“十方九草,无草不成方”之说,被称为“国老”^[1]。相关文献记载甘草的主要炮制品有蜜炙甘草、清炒甘草^[2],以及运用现代方法炮制的微波加热制甘草^[3]。微波加热炮制是物料吸收微波能后通过偶极子旋转和离子传导2种方式从内、外同时加热,而传统的热处理是以热传导、热辐射的方式由外向内进行,温度上升缓慢。微波加热炮制的优点是被炮制药物吸收微波能使细胞内部温度迅速上升,细胞内外形成压力差导致细胞壁破裂,从而使细胞内成分更易于溶出,并且微波加热炮制不但火力和时间易控制,且操作简单,加工后饮片色泽美观,洁净一致,弥补传统炮制方法在工艺上的不足^[4,5]。中药炮制的目的主要是改变中药的性味和功能,达到缓和药性、减毒增效等作用^[6]。甘草经炮制后增强补脾益胃、缓急止痛、托疮排毒等功效,以便于临床合理用药,确保疗效。研究表明,甘草中含有400多个化合物,主要分为黄酮类、三萜类、三萜皂苷类、二苯乙烯类、香豆素类等5类化合物,其中三萜皂苷类成分主要是甘草酸、甘草次酸等,黄酮类成分主要是甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素等^[7]。化学计量学是一种新兴的计数分析方法,能够将中药化学中色谱法、光谱法、气相色谱-质谱法联用技术等方法得出的大量样本数据进行快速、全面地鉴别归类,其方法主要包括聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least square discriminate analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square

discriminate analysis, OPLS-DA)等^[8,9]。本文通过高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合CA、PCA、PLS-DA、OPLS-DA等化学计量学方法比较甘草经微波制与传统炮制的差异,为现代微波加热炮制方法的可行性提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括在线脱气机,四元泵,自动进样器,柱温箱,DAD型检测器);BT125D电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PL-S60超声波清洗器(康士洁牌数码超声波清洗机);FLP-500A高速多功能摇摆粉碎机(上海菲力博实业公司);SHB-3循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);DHG-9123A电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012年,130723版)软件;simca 14.1分析软件;spss 19.0分析软件。

1.2 试剂

对照品:芹糖甘草苷(批号:PS011457)、异甘草苷(批号:PS020442)、甘草素(批号:PS010083)、甘草苷(批号:PS012028)、甘草酸(批号:PS010448),对照品均为色谱纯,含量均 $\geq 98.0\%$,厂家均为成都普思生物科技股份有限公司。试剂:磷酸(分析纯,批号:20140609,含量 $\geq 85.0\%$);甲醇(色谱纯,批号:20190713,含量 $\geq 99.9\%$);乙腈(色谱纯,批号:20190401,含量 $\geq 99.9\%$);无水乙醇(分析纯,20181217含量 $\geq 99.7\%$);厂家均为天津大茂化学试剂厂。

1.3 药材

生甘草(S1~S10)为市售成型饮片(来源见表1),清炒甘草、微波制甘草和蜜炙甘草均由生甘草饮片自制所得。所购生甘草饮片和蜜炙甘草饮片经甘肃中医药大学药学院王明伟副教授鉴定为2015版《中国药典》“甘草”项下甘草豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)饮片。

表1 10批生甘草饮片来源信息

Table 1 Source of 10 batches of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma pieces

编号 No.	批号 Batch No.	产地 Source	药店 Pharmacy	生产厂家 Manufacturer
S1	180920	内蒙	兰州惠仁堂药房	安徽广和中药股份有限公司
S2	180518	甘肃	兰州德生堂药房	甘肃众翔生物科技有限公司

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	批号 Batch No.	产地 Source	药店 Pharmacy	生产厂家 Manufacturer
S3	20181104	甘肃	至仁同济大药房	甘肃中药科技有限公司
S4	201803001	甘肃	兰州惠灵大药房	陇西奇正药材有限责任公司
S5	180929	内蒙	兰州惠仁堂药房	安徽广和中药股份有限公司
S6	1810042	甘肃	兰州安泰堂药店	甘肃天士力中天药业
S7	A180101	新疆	兰州泰来堂药店	湖北金贵中药饮片有限公司
S8	20171102	甘肃	兰州德生堂大药房	甘肃复兴厚生物医药科技有限公司
S9	20180616	甘肃	兰州顺民大药房	甘肃和顺元中药饮片有限公司
S10	1808005	甘肃	兰州众友大药房	甘肃众友药业制药有限公司

2 方法与结果

2.1 清炒甘草、微波制甘草、蜜炙甘草饮片的制备

2.1.1 清炒甘草的制备

取收集的 10 批生甘草饮片,置炒炙容器内炒至表面深黄色,略有焦点,香味较浓时取出,放凉,筛去碎屑,得到 10 批自制清炒甘草饮片(C1 ~ C10)^[10]。

2.1.2 微波制甘草的制备

对收集 10 批次生甘草饮片筛选,均取厚度为 0.5 cm 饮片,均采用微波炉中火,微波加热 10 min 进行炮制,取出,常温晾干,得到 10 批自制微波制甘草饮片(W1 ~ W10)^[3]。

2.1.3 蜜炙甘草的制备

将炼蜜和水 2:1 混合(W/W)加入生甘草片,拌匀,闷润 30 min,置炒锅内,130 °C 炙炒 20 min,取出,放凉,筛去碎屑。即得蜜炙甘草饮片(M1 ~ M10)。每 100 kg 甘草加炼蜜 25 kg^[11]。

2.2 色谱条件

根据《中国药典》2015 版“甘草”项下色谱条件:Agilent1260 型高效液相色谱仪;色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B),梯度洗脱:0 ~ 8 min, 19% A; 8 ~ 35 min, 19% → 50% A; 35 ~ 36 min, 50% → 100% A; 36 ~ 40 min, 100% → 19% A; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长 237 nm。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸对照品适量,分别加 70% 乙醇超声溶解,制备成质量浓度分别为 0.30、0.20、0.31、0.21、0.40 mg/mL 的单一对照品溶液;精密吸取上述储备液适量,混合后加 70% 乙醇稀释,使最终制成适宜浓度的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取甘草饮片粉末(过三号筛),精密称定 0.2 g,放入具塞锥形瓶中,加入浓度为 70% 的乙醇溶液

100 mL,密塞,天平称重,置入超声仪做超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 30 min,放置冷却至室温,再次称重,用 70% 乙醇将以上步骤失去的重量补足,摇匀,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作为待测供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验

取生甘草样品(编号:S1,批号:180920)按“2.4”项方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下连续进样 6 次,以成分甘草苷峰的保留时间和峰面积为参照,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明共有峰的相对保留时间 RSD 均不大于 1.81%,相对峰面积 RSD 均不大于 2.32%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验

平行取生甘草样品(编号:S1,批号:180920)6 份,按“2.4”项方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下分别进样测定分析,以成分甘草苷峰的保留时间和峰面积为参照,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明共有峰的相对保留时间 RSD 均不大于 1.68%,相对峰面积 RSD 均不大于 2.65%,表明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验

取生甘草样品(编号:S1,批号:180920)按“2.4”项方法制备供试品溶液,以“2.2”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定分析。以成分甘草苷峰的保留时间和峰面积为参照,计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明共有峰的相对保留时间 RSD 均不大于 1.62%,相对峰面积 RSD 均不大于 2.86%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 甘草及其不同炮制品指纹图谱测定

取上述生甘草饮片、清炒甘草饮片、微波制甘草饮片、蜜炙甘草饮片各 10 批,按“2.4”项下方法制

备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下检测,分别得到生甘草饮片(S1~S10)、清炒甘草饮片(C1~C10)、微波制甘草饮片(W1~W10)、蜜炙甘草饮片(M1~M10)HPLC指纹图谱(见图1),分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012年,130723版),均以相似度软件内S1为参照图谱,采用平均数法,时间窗宽度为0.1,全谱峰匹配后得到生甘草饮片、清炒甘草饮片、微波制甘草饮片、蜜炙甘草饮片各10批次HPLC指纹图谱叠加图及共有模式图(见图2),生甘草和蜜炙甘草均标定了17个共有

峰,清炒甘草和微波制甘草均标定了14个共有峰,其中16号共有峰峰型较好,峰面积较大,且在每个样品中稳定存在,经对照品指认为甘草酸,故选该峰为参照峰。计算甘草不同炮制品批次样品指纹图谱与各自生成的对照指纹图谱的相似度在0.883~0.991之间,其中样品编号S5、C1、C5的相似度较小,在0.883~0.90之间(见表2),相似度值表明甘草四种炮制品各批次之间总体相似度较高,炮制工艺稳定可行,能够为评价不同炮制方法提供基础。

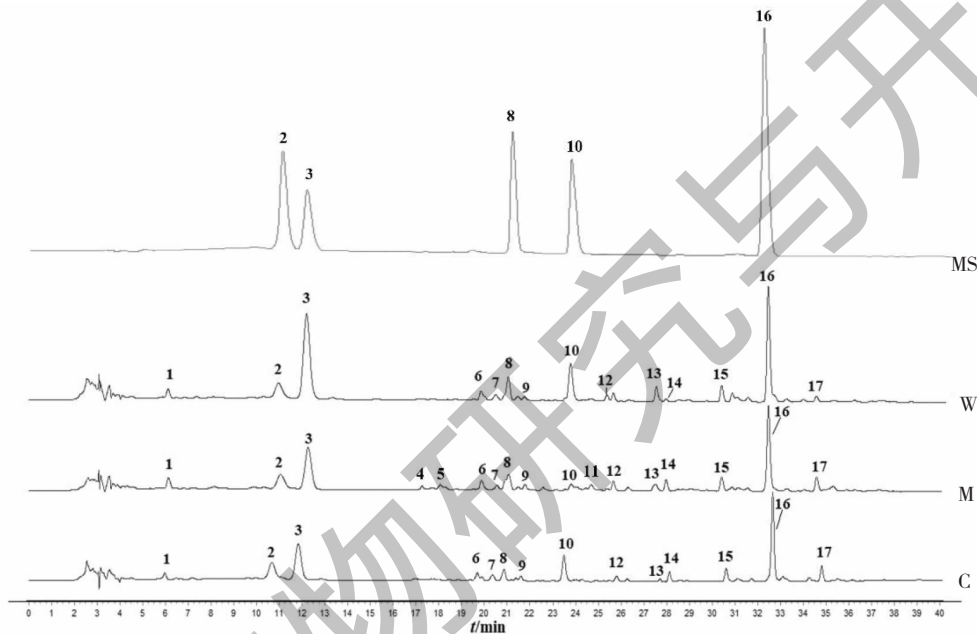


图1 混合标准品(MS)、微波制甘草(W)、蜜炙甘草(M)及清炒甘草(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (MS), microwave-processed licorice (W), honey roasted licorice (M) and stir-fried licorice (C)

注:2:芹糖甘草苷;3:甘草苷;8:异甘草苷;10:甘草素;16:甘草酸。Note:2: Glycyrrhiza uralensis; 3: Glycyrrhizin; 8: Isoliquiritin; 10: Glycyrrhizin; 16: Glycyrrhizinate.

表2 甘草四种炮制品的相似度

Table 2 Similarity of four processed products of licorice

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.966	C1	0.886	W1	0.990	M1	0.977
S2	0.968	C2	0.946	W2	0.986	M2	0.935
S3	0.928	C3	0.918	W3	0.987	M3	0.977
S4	0.959	C4	0.939	W4	0.962	M4	0.985
S5	0.886	C5	0.883	W5	0.992	M5	0.937
S6	0.944	C6	0.938	W6	0.990	M6	0.960
S7	0.954	C7	0.930	W7	0.995	M7	0.975
S8	0.914	C8	0.924	W8	0.997	M8	0.980
S9	0.934	C9	0.932	W9	0.987	M9	0.991
S10	0.971	C10	0.924	W10	0.990	M10	0.925
R	1	R	1	R	1	R	1

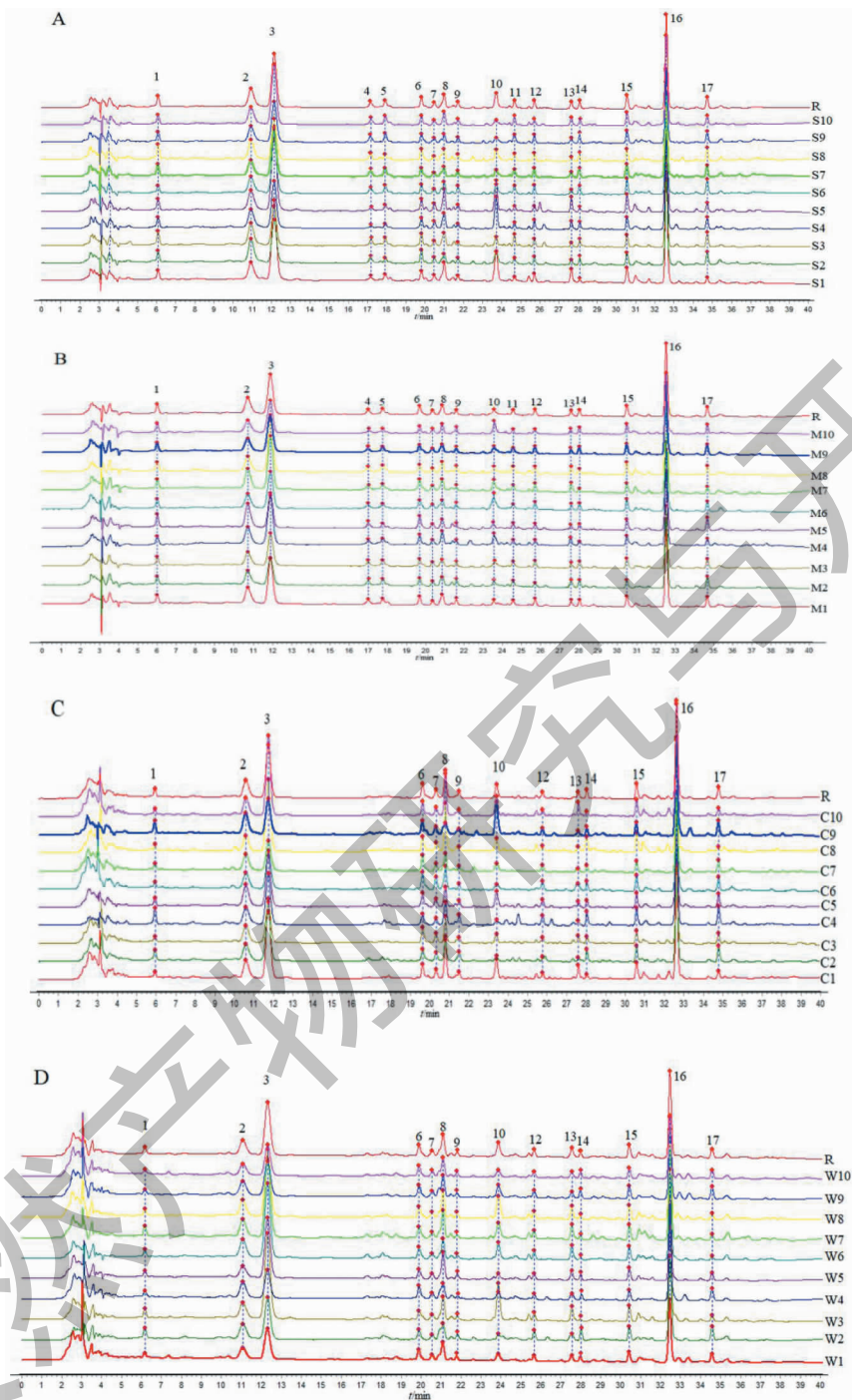


图2 甘草不同炮制品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of different processed licorice products

注:A:生甘草;B:蜜炙甘草;C:清炒甘草;D:微波制甘草;S1~S10为10批生甘草样品;C1~C10为10批清炒甘草样品;W1~W10为10批微波制甘草样品;M1~M10为10批蜜炙甘草样品,下同。Note:A:Raw licorice;B:Honey roasted licorice;C:Stir-fried licorice;D: Microwave-processed licorice;S1-S10 are 10 batches of raw licorice;C1-C10 are 10 batches of stir-fried licorice;W1-W10 are 10 batches of microwave-processed licorice;M1-M10 are 10 batches of honey roasted licorice, the same below.

2.7 化学识别模式分析

2.7.1 聚类分析(CA)

聚类分析是一种常见的无监督的化学计量学方

法,可简单有效的将具有相似特点的样品归为一类,能够区分差异样品^[12]。将甘草饮片生品、清炒品、微波制品、蜜炙品各10批次共有峰的相对峰面积

表3 甘草四种炮制品 HPLC 共有峰保留时间、相对峰面积

Table 3 HPLC common peak retention time, relative peak area of the four processed licorice products

编号 No.	生甘草 Raw licorice		蜜炙甘草 Honey roasted licorice		炒甘草 Stir-fried licorice		微波制甘草 Microwave-processed licorice	
	t_R (min)	S	t_R (min)	S	t_R (min)	S	t_R (min)	S
1	6.079	0.110 ± 0.033	6.005	0.130 ± 0.030	5.933	0.080 ± 0.045	6.165	0.070 ± 0.017
2	10.924	0.470 ± 0.093	10.719	0.480 ± 0.070	10.588	0.410 ± 0.071	11.071	0.360 ± 0.051
3	12.135	1.160 ± 0.201	11.901	1.100 ± 0.202	11.739	1.050 ± 0.250	12.311	1.170 ± 0.327
4	17.173	0.080 ± 0.024	16.996	0.680 ± 0.132	-	-	-	-
5	17.935	0.070 ± 0.026	17.763	0.720 ± 0.282	-	-	-	-
6	19.817	0.120 ± 0.020	19.680	0.130 ± 0.035	19.629	0.160 ± 0.044	19.899	0.140 ± 0.027
7	20.492	0.060 ± 0.007	20.357	0.070 ± 0.009	20.317	0.090 ± 0.017	20.56	0.070 ± 0.014
8	21.006	0.170 ± 0.021	20.863	0.160 ± 0.019	20.802	0.300 ± 0.087	21.101	0.300 ± 0.052
9	21.725	0.070 ± 0.017	21.592	0.070 ± 0.019	21.505	0.080 ± 0.023	21.808	0.050 ± 0.010
10	23.714	0.180 ± 0.109	23.571	0.100 ± 0.014	23.415	0.160 ± 0.096	23.869	0.180 ± 0.109
11	24.67	0.080 ± 0.031	24.551	0.070 ± 0.009	-	-	-	-
12	25.713	0.080 ± 0.016	25.703	0.080 ± 0.012	25.78	0.060 ± 0.023	25.663	0.070 ± 0.010
13	27.634	0.080 ± 0.025	27.575	0.070 ± 0.020	27.609	0.070 ± 0.032	27.553	0.120 ± 0.026
14	28.07	0.070 ± 0.021	28.011	0.070 ± 0.019	28.044	0.080 ± 0.031	27.993	0.070 ± 0.021
15	30.545	0.140 ± 0.013	30.492	0.140 ± 0.021	30.584	0.150 ± 0.017	30.43	0.140 ± 0.013
16*	32.594	1	32.538	1	32.634	1	32.469	1
17	34.728	0.110 ± 0.034	34.682	0.130 ± 0.026	34.786	0.120 ± 0.043	34.576	0.100 ± 0.047

注:S:相对峰面积($\bar{x} + s, n = 10$); * 参照峰。

Note: S: Relative peak area ($\bar{x} + s, n = 10$); * Reference peak.

(见表3)导入 SPSS 19.0 分析软件,采用组间 Ward 联接方法,对甘草四种炮制品进行聚类分析(见图3)。结果发现生甘草和蜜炙甘草在甘草四种炮制品种各自分类效果较好,而微波制甘草和清炒甘草无法分开,提示甘草经微波制和清炒后可能有一定共性,可以将甘草四种炮制品分为三类:Clade I 为蜜炙甘草,Clade II 为生甘草,Clade III 为清炒甘草和微波制甘草。

2.7.2 主成分分析(PCA)

将甘草生品、清炒品、微波制品、蜜炙品各 10 批次共有峰的峰面积数据(清炒甘草和蜜炙甘草 4 号、5 号、11 号峰面积记为 0)导入 SIMCA 14.1 分析软件,基于 PCA 建立无监督的模式识别模型,观察样品的组内聚集和组间分离趋势^[13],结果如图 4A,自动拟合出三个主成分(PC1、PC2、PC3),累计贡献率达到 71.359%,能够较全面的反应出甘草四种炮制品种之间的样品差异。从 PCA 得分图显示,甘草不同炮制品的样品基本可以各自聚为一类,其中生甘草和蜜炙甘草在距离上完全显示出差异,清炒甘

草和微波制甘草距离较近,且有一部分没有完全分开,反映出甘草经清炒和微波制后在某些方面的相似性,该结果与 CA 结果一致。

图 4B-1 和图 4B-2 分别为 PC1 与 PC2、PC1 与 PC3 的载荷图,载荷图能够反映各色谱峰在主成分中所占的比例,其中离 X = 0 纵轴距离越远的点对 PC1 的贡献越大,而离 Y = 0 纵轴距离越远的点对 PC2、PC3 的贡献越大^[14]。可见,甘草四种炮制品中除生品、蜜炙品和清炒品、微波制品的 4 号、5 号和 11 号三个差异峰对 PC1 贡献度较大外,8 号峰距离 X = 0 的纵轴距离最远,对 PC1 的贡献度最大,其余峰按贡献度从大到小依次为 7 > 16 > 15 > 13 > 6 > 3 > 10 > 1 > 9 > 17 > 14 > 2 > 12;图 4B-1 显示,对 PC2 的贡献度从大到小依次为 2 > 16 > 1 > 12 > 15 > 11 > 4 > 3 > 10 > 5 > 14 > 17 > 9 > 7 > 8 > 13 > 6,图 4B-2 显示对 PC3 的贡献度从大到小依次为 17 > 14 > 13 > 3 > 9 > 10 > 6 > 7 > 5 > 4 > 11 > 1 > 2 > 16 > 8 > 15 > 12。根据 HPLC 对照品色谱峰指认出 8 号峰为异甘草苷,2 号峰为芹糖甘草苷,3 号峰为甘草苷,10

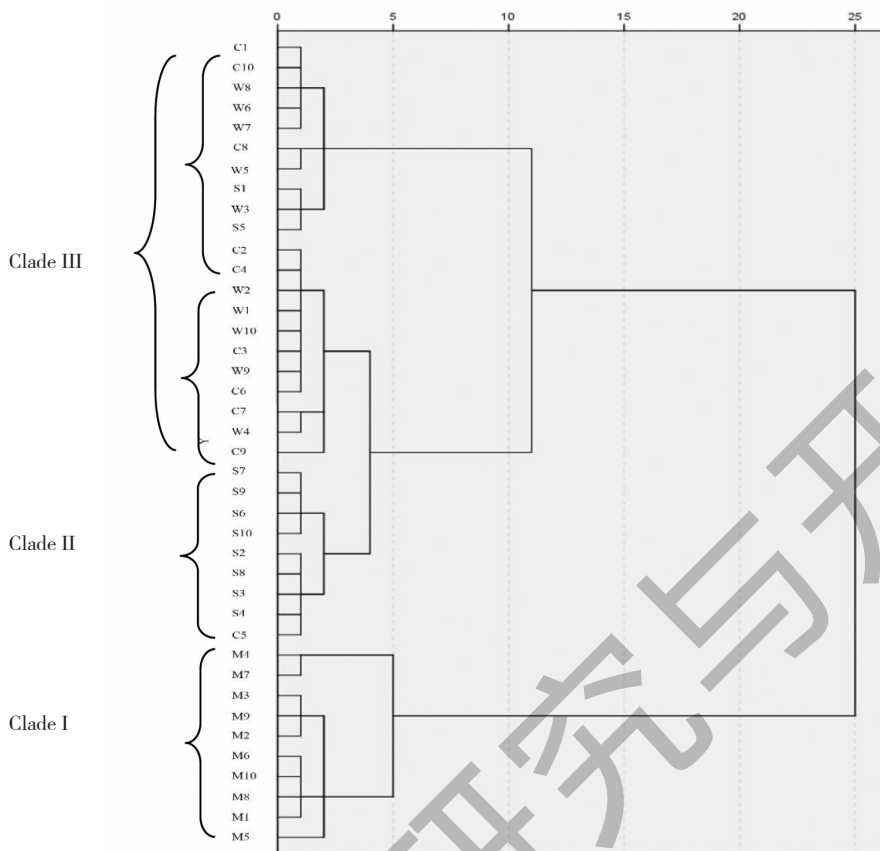


图3 甘草四种炮制品的 CA 图

Fig. 3 CA of four processed licorice products

号峰为甘草素,16号峰为甘草酸。根据载荷图结果发现,造成甘草四种炮制品差异的峰除了4、5、11号峰为生甘草和蜜炙甘草特有成分峰外,主要为8号峰异甘草苷。

2.7.3 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)与正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

PLS-DA及OPLS-DA均属于有监督的模式识别分析。在PCA的基础上对甘草四种炮制品进行PLS-DA,结果如图5A。PLS-DA模型中以 R^2Y 和 Q^2Y 分别表示累积的自变量(X)对Y的解释能力和模型的预测能力,当 $Q^2Y > 0.50$ 且 $0 < R^2Y - Q^2Y < 0.2-0.3$ 时,表明建立的PLS-DA模型良好^[15]。本实验选取前3个主成分, R^2Y 和 Q^2Y 分别达0.661和0.508,且 $R^2Y - Q^2Y = 0.153$,说明模型预测能力良好;图5B为PLS-DA模型的验证图, R^2 和 Q^2 分别表示累积的自变量(X)对Y的解释能力和对模型的预测能力,二者的截距分别为0.12和0.321,与横坐标轴交点均小于0.5,与纵坐标轴交点均小于1,且所有左边的 R^2 和 Q^2 值均低于最右边的值,表明建

立的PLS-DA模型没有出现拟合现象,具有较好的预测能力。由图5A可知甘草四种炮制品各自聚类效果良好,但清炒甘草和微波制甘草聚类效果较差;因此继续对清炒甘草和微波制甘草作两两比较的OPLS-DA,如图6A,结果显示除离群样品C4外,清炒甘草和微波制甘草完全各自聚类,说明甘草经微波制后和清炒有差异,这可能是由于微波加热和清炒加热炒炙的原理不同所致。

2.7.4 差异成分分析

基于上述实验结果,分别对微波制甘草和生甘草、微波制甘草和蜜炙甘草建立OPLS-DA模型,如图6B、C;经验证,模型均具有良好的预测能力。然后在OPLS-DA模型基础上对微波制甘草和生甘草、微波制甘草和清炒甘草、微波制甘草和蜜炙甘草的共有峰面积进行差异成分分析。根据变量重要性投影(VIP)法, $VIP > 1.0$ 时,说明二者成分差异具有统计学意义, VIP 值越大,说明对应色谱峰对于二者的分类贡献度越大。微波制甘草和生甘草OPLS-DA模型的VIP见图7,其中在17个成分峰当中 $VIP >$

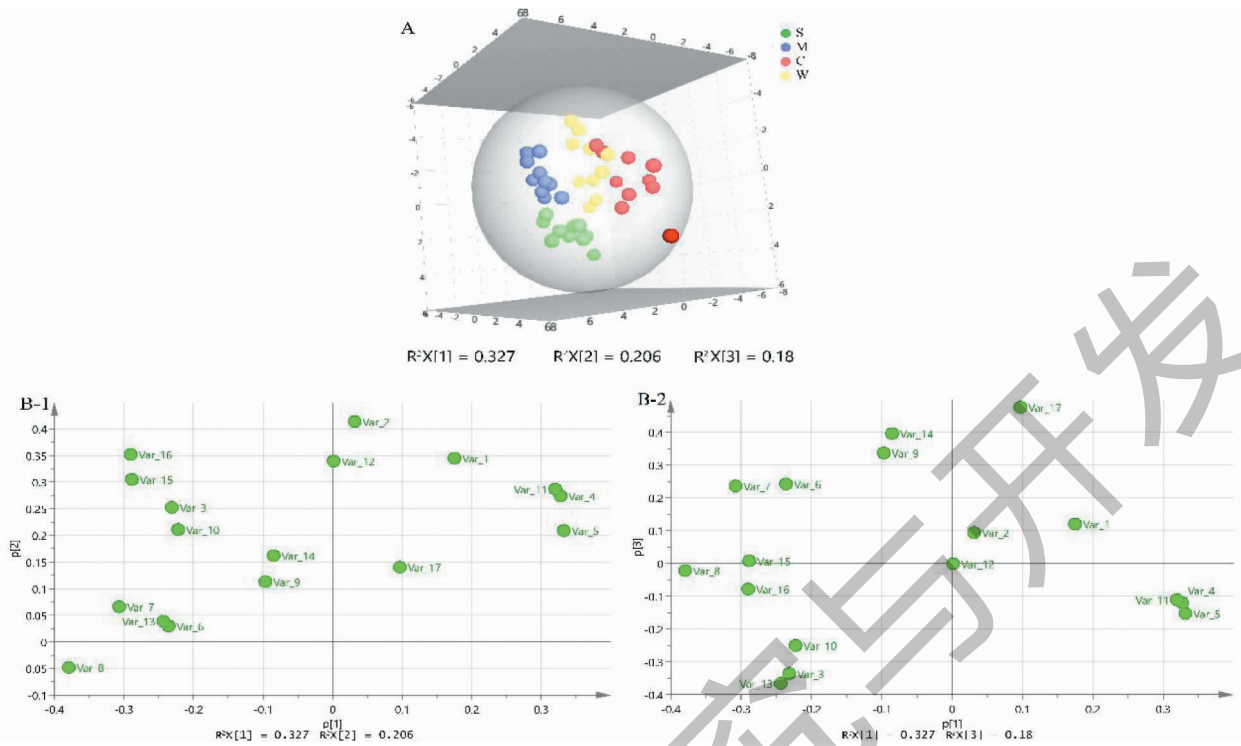


图4 甘草四种炮制品 PCA 模型的得分图(A)及载荷图(B)

Fig. 4 PCA model scores diagram (A) and loading diagram (B) of four processed licorice products

注:S:生甘草;M:蜜炙甘草;C:清炒甘草;W:微波制甘草,下同。Note:S:Raw licorice;M:Honey roasted licorice;C:Stir-fried licorice;W: Microwave-processed licorice, the same below.

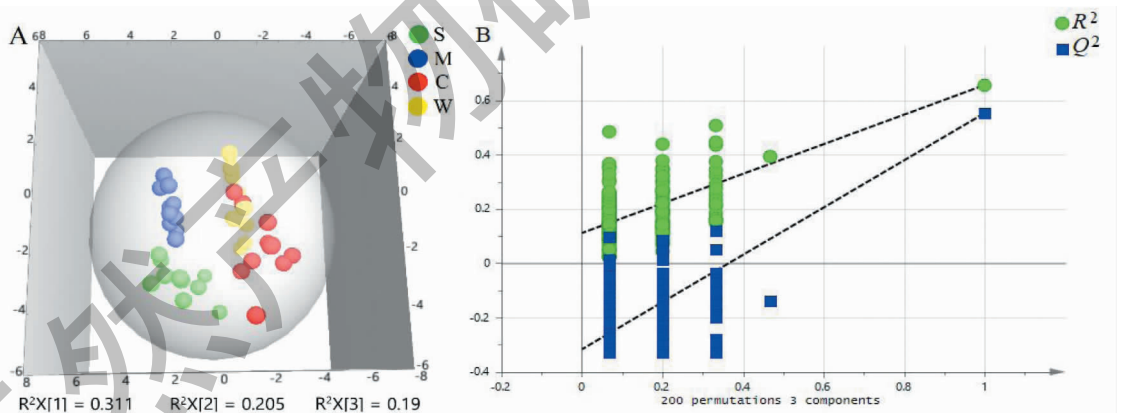


图5 甘草四种炮制品 PLS-DA 模型得分图(A)及模型检验图(B)

Fig. 5 OPLS-DA model score diagram (A) and model test diagram (B) of four processed licorice products

1.0 的有 6 个峰,按 VIP 值大小依次为 4、11、5、2、1、8 号色谱峰,其中除去微波制甘草不含有的 4、11、5 号色谱峰,确定出微波制甘草和生甘草的主要差异色谱峰为 2、1、8 号。微波制甘草和清炒甘草 OPLS-DA 模型的 VIP 见图 8,由于微波制甘草和清炒甘草的 HPLC 指纹图谱均不含 4、5、11 号色谱峰,因此二者在此三个峰的 VIP 值为 0;剩余 14 个成分峰中 VIP > 1.0 的有 9 个色谱峰,按 VIP 大小依次为:7、

2、9、15、6、13、17、16、14 号色谱峰。微波制甘草和蜜炙甘草 OPLS-DA 模型的 VIP 见图 9,其中在 17 个成分峰当中 VIP > 1.0 的有 7 个峰,按 VIP 值大小依次为 4、11、8、5、13、7、16 号色谱峰,其中去掉峰微波制甘草不含有的 4、11、5 号色谱,确定出微波制甘草和蜜炙甘草的主要差异色谱峰为 8、13、7、16 号色谱峰。差异成分中 2 号峰为芹糖甘草苷,8 号峰为异甘草苷,16 号峰为甘草酸。

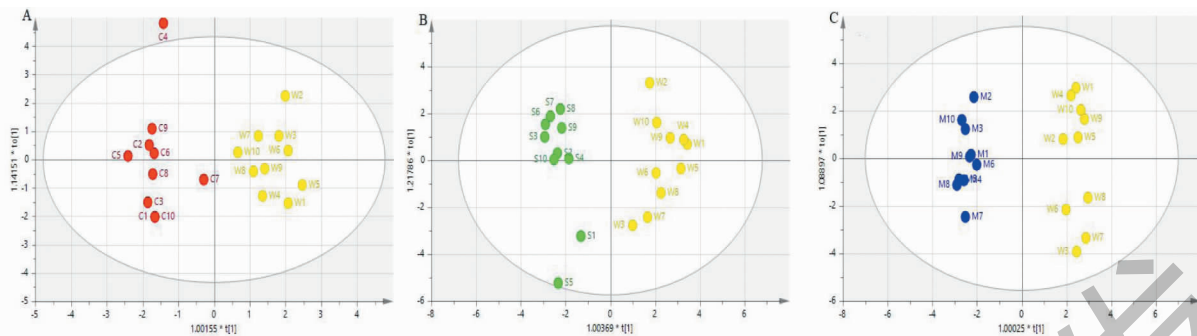


图 6 甘草微波炮制品与其他炮制品的 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score chart of licorice microwave processed products and other processed product

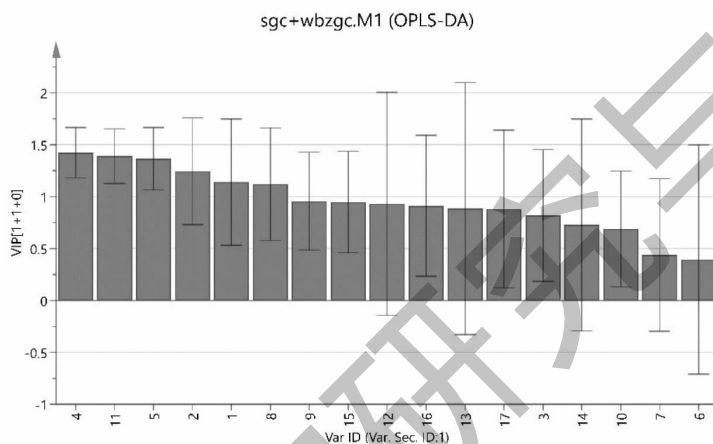


图 7 微波制甘草和生甘草 OPLS-DA 模型的 VIP

Fig. 7 VIP of microwave-processed licorice and raw licorice OPLS-DA model

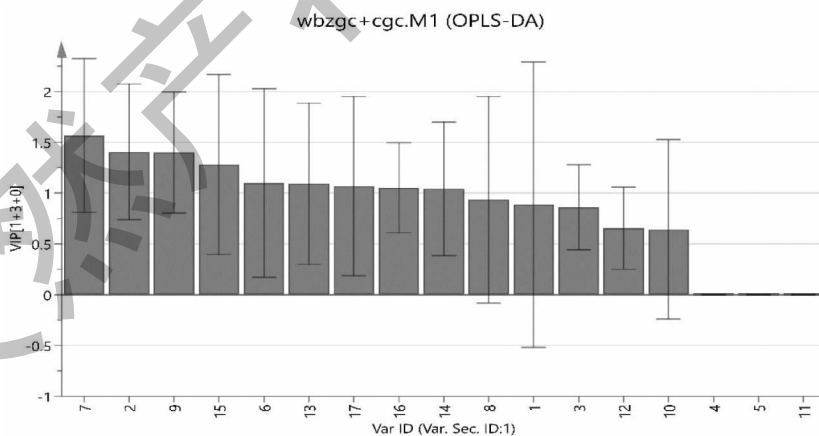


图 8 微波制甘草和清炒甘草 OPLS-DA 模型的 VIP

Fig. 8 VIP of stir-fried licorice and microwave-processed licorice OPLS-DA model

3 讨论

中医药的发展离不开传承与创新,运用现代炮制技术炮制中药是对中药炮制技术的创新,有利于中医药现代化的发展。微波加热的现代炮制方法不

仅操作简单而且耗时短,能有效提高能源的利用率,干燥时所需温度低,且干燥用时短,较之传统的炮制法有非常明显的优势。本实验建立甘草生品及其炮制品的 HPLC 指纹图谱,并结合化学计量学方法,比

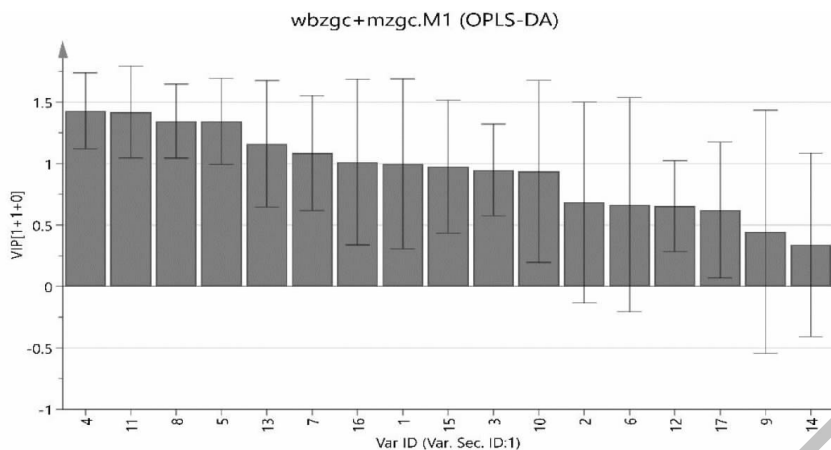


图9 微波制甘草和蜜炙甘草 OPLS-DA 模型的 VIP

Fig. 9 VIP of honey roasted licorice and stir-fried licorice OPLS-DA model

较甘草经微波制与传统炮制的差异。从指纹图谱可以直观看出,甘草生品与蜜炙品化学组分相同,而经清炒和微波制后少了4、5、11号色谱峰,提示生甘草在清炒或微波加热炮制过程中,某些成分可能发生了变化,经对照品比对,未能指认,需进一步研究;相似度评价显示甘草生品及炮制品各批次间相似度高,说明炮制工艺稳定可行。CA显示,甘草蜜炙品与其他炮制品可清晰区分,表明蜜炙过程中辅料炼蜜的加入对甘草化学成分含量的影响较大;甘草生品和蜜炙品能各自聚类,清炒品和微波制品不能各自聚类,表明清炒和微波制甘草化学特征相似,提示微波加热炮制方法具有一定可行性。PCA和OPLS-DA显示,甘草生品及其炮制品基本能各自聚类,清炒品和微波制品存在小部分交叉,与CA结果一致。清炒品和微波制品进一步做两两比较的OPLS-DA后,聚类效果好,因此OPLS-DA分析更适用于甘草及其炮制品的判别分析;PCA得到与甘草不同炮制品关系密切的成分为4、5、11、8号峰,OPLS-DA差异成分分析显示,微波制甘草和生甘草的主要差异色谱峰为2、1、8号色谱峰,微波制甘草和清炒甘草的差异成分峰为7、2、9、15、6、13、17、16、14号色谱峰,微波制甘草和蜜炙甘草的主要差异色谱峰为8、13、7、16号色谱峰,这些成分可能是甘草微波制品与生品及其他炮制品功效差异的物质基础。

综上所述,甘草经过微波加热炮制后化学成分的确发生了变化,并且有其独特的优势。尽管CA、PCA及PLS-DA分析结果显示甘草经微波制与清炒后距离较近,在一定程度上存在共性,这可能是由于这两种炮制方法均为甘草不加辅料加热炮制的共

性造成;但OPLS-DA分析中的VIP结果显示,微波制甘草与清炒甘草相较于蜜炙及生甘草在化学成分上有很大差异,显示出微波加热与普通加热原理上的不同。运用现代化炮制技术对于中药现代化的发展具有推动作用,研究并阐明其炮制原理更能产生深远影响。甘草所含化学成分复杂,其化学成分及含量的变化是否能引起功效差异有待于后续药理学实验验证。

参考文献

- 1 Bao Y, Li YH, Yang ZG. Advances in metabolomics research of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49:4662-4669.
- 2 Song HW. The literature research of licorice [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine (山东中医药大学), 2015.
- 3 Li YF, Yan XK. Orthogonal test method to optimize the best microwave processing technology of licorice [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2012, 35:202-203.
- 4 Zhu WX, Chang HL, Li XY. New development of microwave processing Chinese medicine [J]. *Chin Pharm* (中国药房), 2008, 19:1433-1435.
- 5 Geng Y, Jia TZ. Research progress of microwave technology in Chinese medicine processing [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2007, 9(6):25-27.
- 6 Chen B, Xu HL, Jia XB. Research progress and thought on processing of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44:482-487.
- 7 Sun LL, You GJ, Ren XL, et al. Rapid identification on chemical constituents and chemical pattern recognition of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. *China J Tradit Chin Med*

- Pharm(中华中医药杂志),2018,33:2074-2079.
- 8 Fan LH, Fan WX, Wei ZQ, et al. Application status of near infrared spectroscopy combined with chemometrics in analysis of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(24): 205-210.
 - 9 Yu Y, Li J, Li BG. Application of chemometrics in research on quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2018, 40: 1139-1142.
 - 10 Sun FJ, Zhou Q, Wang CF, et al. Comparison of pharmacodynamics of licorice before and after processing [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(17): 115-118.
 - 11 Zhou Q, Zhang T, Shi DH, et al. Optimization of the honey-fried processing for Radix et Rhizoma Glycyrrhizae by orthogonal design [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32: 447-450.
 - 12 Yang GY, Xue ZJ, Zhang D, et al. Chemical comparison of *Salvia miltiorrhiza* phloem and xylem based on fingerprint analysis and quantitative analysis of multi-components [J]. China Tradit Herb Mater Drugs(中草药), 2019, 50: 5328-5335.
 - 13 Qin YD, Wang RB, Fang FM, et al. Characteristics research on dynamic changes of secondary metabolites in *Bletilla striata* for different harvest time combined with chemical pattern recognition [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32: 11-17.
 - 14 Wang YD, Dai Z, Sun CL, et al. Quality control of Guci tablets using UPLC-ELSD fingerprint analysis coupled with chemometrics [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43: 1156-1161.
 - 15 Li GW, Suo CX, Wu WP, et al. Multi-indicative component analysis of different species of *Terminalia* L. based on multivariate statistical analysis [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33: 23-33.
-
- (上接第 836 页)
- 17 Wang JP, Liu BG, Tang N, et al. Effects of 'warming yang and benefiting qi and resolving turbidity method' on Alzheimer's disease and its modern microscopic mechanism on the basis of cell autophagy [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2017, 32: 114-116.
 - 18 Li YW, Zhu CC, Wang ZQ, et al. Preliminary study on the relationship between the function of warming yang and detoxification methods of Radix Aconiti Lateralis Praeparata [J]. J Hunan Univ Chin Med(湖南中医药大学学报), 2019, 39: 781-785.
 - 19 Zhang YL, Wu YP, Liu LT. Research progress on the compatibility of aconitum Chinese medicine for reducing toxicity and increasing efficacy [J]. Guide China Med(中国医药指南), 2017, 15: 10-11.
 - 20 Wang YW, Zhong L, Yang SL, et al. Effect of different treatments on content of 6 kinds of index components in fresh Radix Aconite Lateralis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2015, 26: 1115-1117.
 - 21 Cong J, Ruan Y, Lyu Q, et al. A proton-coupled organic cation antiporter is involved in the blood-brain barrier transport of aconitum alkaloids [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 252: 112581.